

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 181—182, März 1969

Isolierung löslicher Antigene durch spezifische Immunabsorption

Von K. SCHUMACHER und W. SCHNEIDER

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Köln (Direktor: Prof. Dr. R. Gross)

(Eingegangen am 11. Dezember 1968)

Es wird über eine Methode zur Isolierung von Antigenen oder Antikörpern aus Proteingemischen oder Anti-Seren berichtet. Merkmale der Methode sind die Immunabsorption, die Hydrolyse des Antigen-Antikörper-Komplexes im sauren Milieu und die präparative Trennung durch Molekularsiebung. Die Methode wurde zur Isolierung organspezifischer Antigene aus der löslichen Zytoplasmafraktion von Human-Leber verwendet. Voraussetzung zur Gewinnung reiner Antigene sind dabei monospezifische Antikörper, die durch Absorption von Anti-Seren mit zahlreichen Organ-Antigenen gewonnen wurden.

The isolation of soluble antigens by specific immunoabsorption

A method for the isolation of antigens or antibodies from protein mixtures or antisera is described. The main features of the method are immunabsorption, acid hydrolysis and gel-filtration. With the aid of this method an organ-specific antigen from the soluble cytoplasm of human liver was isolated. To obtain pure antigens, monospecific antibodies were prepared by absorption of the antisera with multiple antigens from other organs.

Während für den Nachweis von Antikörpern (1—9) und die Isolierung antikörperhaltiger Immunglobulinfraktionen zahlreiche Methoden zur Verfügung stehen (11—13), bereitet die Isolierung reiner Antigene, insbesondere aus Geweben, große experimentelle Schwierigkeiten. Es soll deshalb über eine Methode zur Isolierung löslicher Antigene aus Human-Leber berichtet werden, bei der wir Immunabsorption und Molekularsiebung im sauren Milieu kombinierten.

Methodik

Herstellung des Antiserums

2,5 kg schwere Kaninchen wurden mit löslichem Zytoplasma aus Human-Leber (14) unter Zusatz gleichen Volumens einer 2proz. Aluminiumhydroxydlösung immunisiert. Die Tiere erhielten 2mal 10 mg Antigenprotein subcutan 2mal wöchentlich. Blutentnahmen aus der Unterschenkelvene der Hinterbeine wurden am 20. und 40. Tag nach Beginn der Immunisierung durchgeführt.

Nach Prüfung der Antiseren auf ihre Antikörperaktivität durch Ansatz in Verdünnungsstufen mit Hilfe der Doppeldiffusion (8) gegen lösliches Zytoplasma aus Human-Leber, -Niere, -Herzmuskel, -Skelettmuskel, -glatte Muskulatur, -Schilddrüse sowie gegen Kerne, Mitochondrien und Mikrosomen aus Human-Leber wurden die Antiseren entsprechend ihren Titern gegen die verschiedenen Antigene mit diesen Antigenen stufenweise bis zur Erschöpfung absorbiert durch Zugabe von lyophilisierten Antigenen.

Immunabsorption und Fraktionierung von Antigen-Antikörper-Komplexen durch Hydrolyse im sauren Milieu

Absorbierte Antiseren und Antigenlösung, eingestellt auf gleichen Proteingehalt (40 mg/ml) wurden im Verhältnis 5:1 vereinigt, gut gemischt und 2 Tage bei 4° inkubiert. Das danach entstandene Präzipitat wurde abzentrifugiert (30 Min. bei 10000 g) und 3mal mit eiskalter 0,9proz. NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat in Glycinpuffer pH 3,2 (0,1M Glykokoll + 0,1M NaCl, mit 0,1N HCl auf pH 3,2 eingestellt) gelöst.

Gelfiltration

Die Fraktionierung der hydrolysierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde durch Molekularsiebung an Sephadex G-200 (Pharmacia, Uppsala) durchgeführt (15). Säule 1000 × 30 mm Puffer: 0,1M Glykokoll, 0,1M NaCl pH 3,2. Elution mit 8 ml/ Stunde, Kühlung 4°. Photometrie der Fraktionen bei 280 nm. Zur annähernden Bestimmung des Molekulargewichtes wurde die Gelpackung mit Substanzen bekannten Molekulargewichtes

geeicht. An Hand der Eichkurve ergab sich aus den Elutionsvolumina das Maß für das Molekulargewicht (16).

Immunoelektrophoresen

Die elektrophoretische Analyse wurde mit Hilfe der Objektträger-Methode nach SCHEIDEGGER (17) durchgeführt. Agar 1,5proz. (Reinagar Behring-Werke, Marburg) in 0,01M Na-Barbiturat-Puffer, pH 8,6 + Cialit 1:10000. Elektrodenpuffer: 0,1M Na-Barbiturat-Puffer pH 8,6. Die Elektrophorese erfolgte in 60 Min. bei 12 mA/Plattenrahmen (LKB-Producter, Stockholm) und etwa 250 Volt. Nach Einfüllen von 80 µl Antiserum erfolgte die Diffusion bei 4° in der Feuchtkammer für 48 Stdn. Die Dokumentation der Präzipitationsbanden wurde durch Photographie der ungefärbten Plättchen im schräg einfallenden Durchlicht vorgenommen.

Proteinbestimmungen wurden nach LOWRY (18) durchgeführt.

Ergebnisse

Nach Mischen des absorbierten Antiserums mit löslichem Zytoplasma aus Human-Leber kam es innerhalb 48 Stunden zu einem feinflockigen Niederschlag, der sich nach Abzentrifugieren in Glycin-Puffer pH 3,2 quantitativ lösen ließ. Der jeweils in einem möglichst kleinen Volumen gelöste Komplex wurde auf die Gelpackung aufgetragen und im sauren Milieu fraktioniert (Abb. 1). Das Elutions-Diagramm zeigte 2 gut voneinander getrennte Fraktionen. Die immunoelektrophoretische Analyse dieser Fraktionen ergab, daß Fraktion I weder mit Anti-Human-Serum, noch mit nicht-absorbiertem Anti-Human-Leber-Zytoplasma-Serum reagierte. Da ein Antiserum gegen Kaninchen γ -Globulin nicht zur Verfügung stand, konnte diese Fraktion immunologisch nicht identifiziert werden. Das Elutionsvolumen dieser Fraktion entsprach einem Molekulargewicht von etwa 150000 (Abb. 2).

Die II. Fraktion nach Gel-Filtration ergab in der Immunoelektrophorese mit Anti-Human-Serum ebenfalls keine Reaktion. Mit Anti-Leber-Zytoplasma-Serum fand sich jedoch eine Präzipitationsbande unter dem Startloch. Die gleiche Bande entstand auch, nachdem das Antiserum mit Human-Serum, -Niere, -glatte Muskulatur, -Herz und Skelettmuskel absorbiert worden war (Abb. 3).

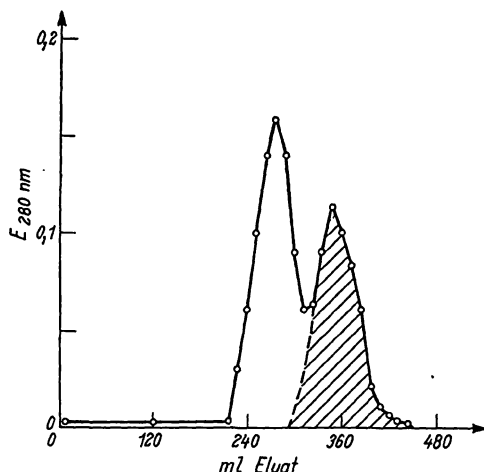


Abb. 1

Fractionierung eines Antigen-Antikörper-Komplexes durch Molekularsiebung im sauren Milieu. Fraktion I dürfte den Antikörper aus Kaninchen-Serum enthalten. Fraktion II (schwarz markiert) enthält ein organspezifisches Antigen aus Human-Leber-Zytoplasma

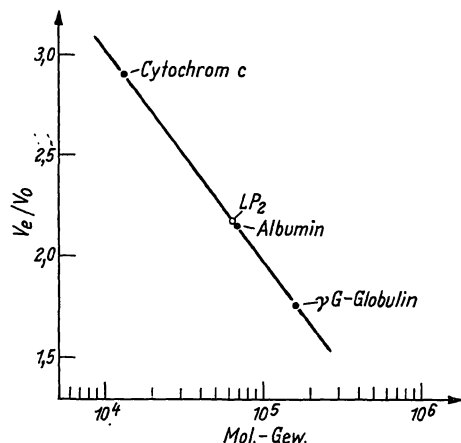


Abb. 2

Molekulargewichts-Bestimmung des isolierten Antigens aus Human-Leber an einer geeichten Gelsäule

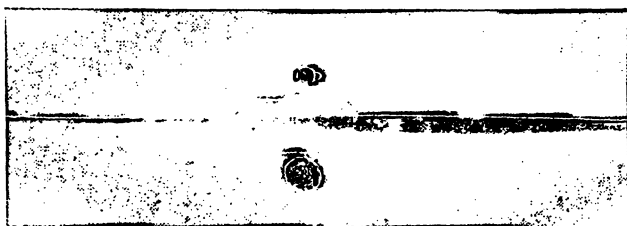


Abb. 3

Immunelektrophoretische Analyse der Fraktion II nach Molekularsiebung, oben: Human-Leber-Zytoplasma, unten: Isoliertes Leber-Antigen, Rinne: Anti-Human-Leber-Zytoplasma-Serum, absorbiert mit Human-Serum, Human-Niere, Herz- und Skelettmuskel

Allerdings fielen die Präzipitationsbanden relativ schwach aus.

Nach dem Elutionsvolumen an der geeichten Gelsäule dürfte das Molekulargewicht der in der II. Fraktion eluierten Substanz einer Größenordnung von etwa 70000 entsprechen.

Diskussion

Die Isolierung reiner Antigene durch Immunabsorption setzt monospezifische Antiseren voraus. Durch Absorption unserer Antiseren gelang es, ein Antiserum herzustellen, das nur noch mit einem Antigen aus der löslichen Zytoplasma-Fraktion reagierte. Der mit dem monospezifischen Antiserum gebildete Antigen-Antikörper-Komplex enthielt ein Antigen, das nach Hydrolyse des Komplexes als elektrophoretisch, immunoelektrophoretisch und nach Molekularsiebung einheitliches Protein angesehen werden muß. Mit Hilfe dieser Methode ist also, unter Verwendung monospezifischer Antiseren, eine Antigen-Isolierung aus Proteingemischen möglich. Gleichweise müßte es möglich sein, unter Verwendung reiner Antigene auch die entsprechenden spezifischen Antikörper aus einem Antiserum zu isolieren.

Sowohl Antikörper als auch Antigene bleiben während des ganzen Isolierungsverfahrens, mit Ausnahme während der Phase der Komplexbildung, wasserlöslich. Eine Änderung der immunologischen Spezifität durch das Trennverfahren wurde nicht beobachtet.

Ob Unterschiede dieser Methode gegenüber anderen Verfahren, die mit wasserunlöslichen Reaktanden arbeiten (19) bezüglich der Ausbeute bestehen, wird vergleichend geprüft.

Das aus der löslichen Zytoplasmafraktion von Human-Leber isolierte Antigen ist nach seiner immunologischen Spezifität als organspezifisch anzusehen. Es unterscheidet sich in der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit etwas von einem durch chromatographische Verfahren isolierten Leberprotein (14); in ihrer Molekülgröße unterscheiden sich die beiden Leber-Antigene dagegen nur wenig. Untersuchungen über weitere chemische Eigenschaften dieser Antigene stehen noch aus.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

Literatur

1. KOLMER, J. A., Amer. J. Publ. Health 26, 126 (1936).
2. WAALER, E., Acta med. scand. 17, 172 (1940).
3. ROSE, H. M., Ch. RAGAN, E. PEARCE und M. O. LIPMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med. (N. Y.) 68, 1 (1948).
4. BOYDEN, S. U., J. Exper. Med. 93, 107 (1951).
5. SCHEIFFARTH, F. und F. LEGLER, Ärztl. Wschr. 6, 660 (1951).
6. MIESCHER, P. und M. FAUCONNET, Experientia (Basel) 10, 252 (1954).
7. SINGER, J. M. und Ch. M. PLOTZ, Arthr. Rheumat. (N. Y.) 1, 142 (1958).
8. OUCHTERLONY, O., Diffusion in gel methods for immunological analysis. In: P. Kallos: Progress in Allergy, S. Karger, Basel, New York (1958).
9. STEFFEN, C., Klin. Wschr. 40, 613 (1962).
10. SOBER, H. A. und E. A. PETERSON, Federation Proc. 17, 1116 (1958).
11. HEIDE, K. und H. HAUPT, Behring-Werke Mitteil. 43, 161 (1964).
12. SCHUMACHER, K., diese Z. 4, 196 (1966).
13. SCHUMACHER, K., Klin. Wschr. 45, 1045 (1967).
14. SCHUMACHER, K. und W. SCHNEIDER, Klin. Wschr. 1969 (im Druck).
15. FLODIN, P. und J. KILLANDER, Biochim. biophysica Acta, Amsterdam 63, 403 (1962).
16. IWATSUBO, M. und A. CURDEL, C. R. Acad. Sci. (Paris) 256, 5224 (1963).
17. SCHEIDEGGER, J. J., Int. Arch. Allergy (Basel) 7, 103 (1955).
18. LOWRY, O. H., M. J. ROSEBROUGH, A. L. FABER und R. J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).
19. AVRAMEAS, S. und T. TERNYNK, J. biol. Chemistry 242, 1651 (1967).

Priv. Doz. Dr. K. Schumacher
5000 Köln-Lindenthal
Josef-Stelzmann-Str. 9